动　物　学　研　究　2012，Apr. 33(2): 158−164　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.02158

西伯利亚鲟 *Tbx3* 基因的克隆和表达分析

张　昊[1,2], 范纯新[1,2], 宋佳坤[1,2,*]

（1. 上海海洋大学 海洋科学研究院海洋生物系统和神经科学研究所, 上海　201306; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海　201306）

摘要：*Tbx3* 基因是一类重要的转录因子，在形态发生和器官形成中发挥着重要作用。该文克隆了西伯利亚鲟 *Tbx3* 基因(*AbTbx3*)cDNA 的全长序列，该 cDNA 全长 2 908 bp，包含一个 2 166 bp 的开放阅读框，编码 721 个氨基酸的多肽。分析表明：AbTbx3 和人 Tbx3 的 T-box 结构域蛋白序列同源性达到 95.2%，三维结构也具有高度的相似性。系统进化分析表明：AbTbx3 与其他物种的 Tbx3 聚为一支，并在一个大的分支上与 Tbx2 聚类。半定量 RT-PCR 显示，*AbTbx3* 基因从西伯利亚鲟囊胚早期即开始表达，且随着发育表达渐强，至尾芽早期表达量达到最大，随后稍有下降；在成体的眼、脑、鳃、肠、胸鳍和腹鳍中有表达，在肝、血液、心脏、肾和肌肉中均未检测到其表达。整体原位杂交表明，在 37 期和 43 期仔鱼的耳泡、后脑、松果体和后部脊索中表达量较高，同时在背鳍芽中也有表达。综上结果表明：西伯利亚鲟 Tbx3 与人 Tbx3 在结构上高度同源，在胚胎、仔鱼和成体中呈时空特异性表达。

关键词：西伯利亚鲟; 软骨硬鳞鱼; Tbx3; 结构; 表达
中图分类号：Q349; Q959.463; Q786　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2012)02-0158-07

Cloning and expression of *Tbx3* gene in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*

ZHANG Hao[1,2], FAN Chun-Xin[1,2], SONG Jia-Kun[1,2,*]

(1. *Institute for Marine Biosystem and Neurosciences, Institutes for Marine Sciences*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*;
2. *College of Fishery and Life Science*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*)

Abstract: *Tbx3*, a member of the TBX2 subfamily of T-box gene family, encodes a transcription factor with a highly conserved DNA-binding domain, which called T-domain. *Tbx3* is involved in morphogenesis and organogenesis in vertebrates, such as limb development, heart remodeling, and neural placode differentiation. In the present study, a full-length 2 908 bp *Tbx3* cDNA from *Acipenser baerii* (*AbTbx3*) was obtained using RT-PCR and RACE technique, which includes a 2 166 bp complete open reading frame encoding a putative peptide of 721 amino acids. AbTbx3 shares 73.5% identity with its human homolog. Particularly, the DNA-binding domain of AbTbx3 shared 95.2% identity with human Tbx3. Phylogenetic analysis revealed that AbTbx3 was grouped with Tbx3s in other vertebrates, which were clustered with Tbx2s and separated from Tbx4/5s. The predicted secondary and three-dimensional structures of the T-domain of AbTbx3 were remarkably similar to human Tbx3. Through semi-quantity RT-PCR, the expression of *AbTbx3* was first detected at blastula stage during Siberian sturgeon embryonic development, increased gradually, reached its peak at early tail-bud stage and then decreased slightly. In adult sturgeon, *AbTbx3* was strongly expressed in eye, brain, gill, intestines, pectoral fin and pelvic fin, but not in liver, blood, heart, kidney and muscle. The whole mount *in situ* hybridization showed that *AbTbx3* was mainly expressed in the otic vesicle, hindbrain, dorsal notochord, pineal organ and dorsal fin bud in the larvae of stage 37 and 43.

Key words: *Acipenser baerii*; Chondrostei; Tbx3; Structure; Expression

早在 1927 年, *Branchyury* (T)基因就在短尾突变体小鼠中完成定位(Dobrovolskaia- Zavadskaia, 1927), 而 Herrmann et al（1990)对该基因进行了克隆, 并发现该基因为一全新的转录因子, 将其命名

收稿日期：2012-01-05；**接受日期**：2012-02-13
基金项目：国家自然科学基金(30970365); 上海市教育委员会科研创新项目(12YZ129); 上海市重点学科水生生物学建设项目(S30701)。
[*]**通信作者**(Corresponding author)，E-mail: jksong@shou.edu.cn; jksong@umd.edu
第一作者简介：张昊(1986-), 男, 硕士研究生, 从事鱼类神经发育生物学研究; E-mail: 13611959621@139.com

为 T-box (*Tbx*)基因。后来相继在果蝇、人、线虫、斑马鱼和爪蟾中发现多个同源基因，它们共同组成了 T-box 基因家族(Papaioannou & Silver, 1998)。T-box 蛋白是一类重要的转录因子，具有一个约 180 个保守氨基酸残基的 T-box 结构域(T-domain)。T-domain 一方面可结合特异的 DNA 序列及形成二聚体(Minguillon & Logan, 2003)，同时还具有一个转录调控结构域，用以激活或抑制下游基因的表达(Conlon et al, 2001)。T-box 基因主要在形体模式、组织分化和器官形成中发挥作用(Wilson & Conlon, 2002)。人类 T-box 基因的异常会导致一系列发育疾病，如腭−心−面综合征（Merscher et al, 2001)，心−肢综合征（Bruneau et al, 2001)和尺骨−乳腺综合征（Jerome-Majewska et al, 2005)。

Tbx3 基因属于 T-box 家族的 TBX2 亚家族(Agulnik et al, 1996)。祖先基因 *Tbx2/3/4/5* 通过基因倍增和变异首先产生 *Tbx2/Tbx3* 和 *Tbx4/Tbx5*，而后进一步分化形成 *Tbx2*、*Tbx3*、*Tbx4* 和 *Tbx5* 四个基因(Wilson & Conlon, 2002)。据推测，这四个基因分歧的时间应在有颌动物起源之前(Horton et al, 2008)。*Tbx3* 主要参与早期发育过程中的肢体、心脏和乳腺等器官的形成(Mesbah et al, 2008; Suziki et al, 2004)，同时还在头部神经基板的分化过程中发挥着重要作用(Takabatake et al, 2002)。在爪蟾和少点猫鲨中，*Tbx3* 在耳泡、晶状体背侧和鼻前区等感觉器官以及头部神经节中表达(O'Neill et al., 2007; Schlosser & Ahrens, 2004)。*Tbx3* 在成体组织中的表达模式研究相对较少，爪蟾成体前后肢中 *Tbx3* 有极弱的表达(Takabatake et al, 2002)，小鼠的下丘脑和延髓中检测到了 *Tbx3* 的表达(Eriksson & Mignot, 2009)。

鲟形目鱼类属软骨硬鳞鱼，有“水中活化石”之称，对研究脊椎动物的起源和进化具有重要意义。目前关于鲟形目 *Tbx3* 基因的研究尚未见报道，本研究以西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)为实验材料，克隆了西伯利亚鲟 *Tbx3* 基因的 cDNA 全长，并对其在胚胎、仔鱼和成体各组织中进行了时空表达分析，为揭示 *Tbx3* 基因在西伯利亚鲟器官形成及成体中的作用奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　胚胎采集

西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)受精卵采自大连永新鲟鱼开发有限公司，在实验室维持水温于 15.5～18 ℃，溶解氧 7.0～8.0 mg/L, pH 6.5～7.5 进行孵化培养(Song et al, 2010)。分别收集 37 期和 43 期的胚胎(分期方法参照 Gibbs & Northcutt, 2004)，一部分浸没于天根公司的 RNA 样品储存液用于 RNA 提取；另一部分用 4%多聚甲醛(PFA)于 4 ℃固定过夜后，并最终置于纯甲醇中。以上两种样品都保存于−80 ℃。

1.2　西伯利亚鲟 *Tbx3* 基因 cDNA 片段的克隆

在无核酶条件下，用天根公司的 RNA 提取试剂盒分离西伯利亚鲟胚胎的总 RNA。利用反转录系统(Promega)，以总 RNA 为模板，oligo (dT)为引物，于 42 ℃孵育 1 h，反转录合成 cDNA。用 DNAStar 中的 MegAlign 对多个相近物种的 Tbx3 蛋白序列进行同源性比对，找出保守结构域，并用 Primer 5.0 在保守结构域对应的 DNA 序列内设计简并引物 *AbTbx3-F* 和 *AbTbx3-R*(表 1)。使用 Promega 公司的 GO-Taq DNA 聚合酶，以反转录所得 cDNA 为模板，加入引物 *AbTbx3-F* 和 *AbTbx3-R* 进行 PCR 反应。程序为：于 95 ℃预变性 2 min，再经过 35 个循环的扩增(95 ℃, 30 s; 53.6 ℃, 30 s; 72 ℃, 1 min)，最后于 72 ℃延伸 7 min。所得 PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测，并用胶回收试剂盒(OMEGA)纯化目的片段，然后连入 pGEM-T 载体(Promega)并转化 TOP10 感受态(天根)。所得菌落经过蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后，送至上海生工生物技术有限公司进行序列测定。

表 1　本实验所使用的引物序列

Tab. 1　Primer sequences used in the experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度(℃) Annealing temperature
AbTbx3-F	*TBATCACMAAATCNGGRAGG*	53.6
AbTbx3-R	*ACDACTTTDGACATCCAYTGYTC*	
Abβ-actin-F	*TTCTTGGGTATGGAATCCTGCG*	60
Abβ-actin-R	*TACAGGTCCTTACGGATGTCAACG*	
RT-AbTbx3-F	*TCAGCGGGTGTTAGCACGATGG*	60
RT-AbTbx3-R	*GCGTTCAGAAAAGGGTGGCGATG*	
AbTbx3-GSP1	*TGGTATGCAGTCACGGCGATGAAGTC*	68
AbTbx3-GSP2	*GGCTGATCCTGAAATGCCCAAGCG*	68

1.3　西伯利亚鲟 *Tbx3* 基因 cDNA 全长的克隆

目的片段测序鉴定为 *Tbx3* 基因后，在该序列内部分别设计 5'-RACE 和 3'-RACE 基因特异性引物 *AbTbx3-GSP1* 和 *AbTbx3-GSP2*(表 1)。利用 RACE

试剂盒(Clontech)以新鲜提取的总 RNA 合成 5'-RACE 和 3'-RACE 的 cDNA 作为模板，分别用特异性引物配合 RACE 试剂盒中的通用引物(UPM)，利用 Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech)进行扩增，克隆西伯利亚鲟 *Tbx3* cDNA 的 5'末端和 3'末端。反应程序为：先以 94 ℃, 30 s; 72 ℃, 3 min 进行 5 个循环；再以 94 ℃, 30 s; 70 ℃, 30 s, 72 ℃, 3 min 进行 5 个循环；最后以 94 ℃, 30 s; 68 ℃, 30 s; 72 ℃, 3 min 进行 20 个循环。PCR 产物的鉴定和测序方法同前，最后将 *Tbx3* cDNA 的 5'末端和 3'末端与前面所得的片段进行拼接，得到全长 cDNA 序列。

1.4 生物信息学分析

将所得 cDNA 序列用 NCBI 网站的 BLAST 工具与 GenBank 数据库中的序列进行同源比对；然后利用 DNASTAR 的 EditSeq 模块分析 cDNA 序列的读码框，推测氨基酸序列的性质。序列同源性比对采用 MEGA4.0 软件中 Clustal W 模块进行，再以邻接法(Neighbor-Jorning, NJ)构建 T-box 基因的系统进化树，以斑马鱼 Tbx15 作为外类群，通过自引导检验(bootstrap)获得系统分支的置信度(重复 1 000 次)。采用 NCBI 网站的 BLASTP 工具确定 *Tbx3* 的 T-Domain，再利用 SWISS-MODEL (SIB)对鲟鱼 *Tbx3* 基因的 T-domain 进行三维结构预测。

1.5 RT-PCR 半定量分析

提取 8 期、10 期、18 期、20 期、22 期、24 期、26 期、29 期、30 期和 32 期的鲟鱼胚胎，以及空腹饲养 2 d 成鱼的眼、脑、鳃、肝、肠、胸鳍、腹鳍、血、心脏、肾脏和肌肉 11 种组织的总 RNA，分别用反转录系统合成 cDNA 模板(方法同上)，采用西伯利亚鲟 *β-actin* 作为内参基因进行 RT-PCR，所采用特异性引物和内参基因见表 1。反应体系均为 20 μL：其中 5×GO Taq reaction buffer 4 μL, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 1.5 μL, dNTP Mix 0.4 μL，上下游引物分别为 1 μL, cDNA 模板 1 μL; GO-Taq DNA polymerase 0.1 μL；用去离子水补足。反应程序为：95 ℃, 2 min 预变性; 28 个循环：95 ℃, 30 s; 60 ℃, 30 s; 72 ℃, 30 s。PCR 产物经 1.5％的琼脂糖凝胶电泳检测分析。

1.6 整体原位杂交

依据 Roche 公司的说明书采用体外转录法合成 *AbTbx3* 基因的反义探针。为保证无核酶污染，所有配制溶液用的水都经过0.1% 焦炭酸二乙酯(DEPC)处理，玻璃容器经 180 ℃高温烘烤 8 h 以上。首先将保存于纯甲醇中的鲟鱼仔鱼经梯度甲醇[用 PBS-Tween 溶液(PBST)配制 100%、75%、50%和 25%的甲醇溶液]复水至 PBST；然后用蛋白酶 K (20 μg/mL)于 37 ℃消化 30 min；用含 2 mg/mL 甘氨酸溶液洗涤仔鱼 10 min；再经 4% PFA 于室温固定 20 min，用三乙醇胺(100 mmol/L, pH 8.0)新鲜配制的 0.25%乙酸酐溶液于室温乙酰化处理 60 min；最后用 PBST 洗涤 3 次，每次 5 min。将仔鱼转至杂交液[50% 去离子甲酰胺；5×SSC (pH 7.0); 0.1% Tween20; 500 mg/mL 酵母 tRNA; 100 μg/mL 肝素]中于 55 ℃预杂交 3 h；然后 *AbTbx3* 反义 RNA 探针进行 2 500 倍稀释后加入新配制的杂交液中，于 55 ℃杂交 12～16 h。为洗去非特异性结合的探针，杂交后的仔鱼先经一系列由 2×SSC 梯度稀释的杂交液(分别含 100%、75%、50%、25%的杂交液和 100%的 2×SSC)于 55 ℃进行洗涤，分别洗 10 min；然后于 55 ℃的 0.2×SSC 中洗涤 2 次，每次 30 min；再经一系列由 PBST 梯度稀释的 0.2×SSC(分别含 75%、50%、25%的 0.2×SSC 和 100%的 PBST)中室温下洗涤，各洗 10 min。用封闭缓冲液(PBST 配制的 1%小牛血清白蛋白溶液)室温封闭胚胎 3 h；然后经 anti-DIG alkaline phosphatase conjugated 抗体溶液(由封闭缓冲液按 1∶8 000 进行稀释)于 4 ℃下孵育过夜；再经过显色缓冲液[100 mmol/L NaCl; 100 mmol/L Tris-HCl (pH 9.5); 50 mmol/L $MgCl_2$; 0.1% Tween-20; 1 mmol/L 左旋咪唑]室温洗涤 3 次；最后在含 4.5 μg/mL NBT 和 3.5 μg/mL BCIP 的显色缓冲液中进行显色反应。显色完成后转入 PBS (pH5.0)中终止反应，在 4% PFA 中固定 10 min 后转入甘油中进行拍照。

2 结 果

2.1 西伯利亚鲟 *Tbx3* 的序列和系统进化分析

我们通过同源克隆得到西伯利亚鲟 *Tbx3* 基因 236 bp 的 cDNA 片段，然后根据获得的序列设计特异性引物，利用 RACE 技术得到一条全长 2 908 bp 的 cDNA(图 1)。利用 NCBI 网站的 BLAST 工具比对发现该序列与斑马鱼 *Tbx3b* 同源性最高，因此，我们将该序列命名为 *AbTbx3*，并将该序列提交 GenBank(登记号：ADW77637)。此序列包含长 2166 bp 的开放阅读框，可编码 721 个氨基酸的蛋白质，推测该蛋白质相对分子质量约为 7.35×10^4，等电点为 7.88，其 5'-非翻译区(UTR)长 584 bp，其中没有起始密码子(ATG); 3'-UTR 长 158 bp，具有一个加尾

```
       GCGGGGACACAAGCGCAGGGAAAATCTTAGTGTTGAGGTTTCGCCTTCTCTCTCTCCTTTCACTGGAGACTGACTCTCTCTTCTTTATTC   90
       GTGTGCAGGGAAAGATACGAATTGTTCTACATAAGCGACGCATCTCAAAAGATCTACTGCTACAAACATTTTGTGCAAGGAGATAAAAAA  180
       AGGCATACCCTTTTTTAAGGAAAAAAATACCGAACTACATTCCTCTGGCTTCCCTGTACGCACATTCTTGACATATATATTGGCCATGCGA  270
       CAAGAAGAAAAGTAACCGTATTTGACTTAAAGAAAAACGGGCGCTTTCAATGCACAACGCGGAGAGAGAACGGGATCACATTTCTCATTT  360
       TGATTTTCTGATTTTTTTTGAGGGATAAACAAATATAAATAAATAAAAAAAAAGGTTCCTTACCTTGCCAGCTGATAGTCTTACTGGGAT  450
       AAGTCTTGGGTTTGACACTTGCAAGCCTTAAAACTTTTTTCCTTGGTGAAAGAAAATGTGCTACTAAAGGAGGCATTGATCGAATAAAAC  540
       CACACACAAAATAAGCAACATCTGGAGCTTCGTTGGTGGAGTGGATGAATTTACCGATGATAGATCCAGTTTTTCCAGGAACGAGTATGG  630
  1                                                         M  N  L  P  M  I  D  P  V  F  P  G  T  S  M  A
       CATATCATCCATTTTTATCTCACCGGGCGCCGGACTTTGCAATGAGTGCTATGTTGGGGCACCAGCATTCCTTTTTCCCGGCCCTTGCGT  720
 17     Y  H  P  F  L  S  H  R  A  P  D  F  A  M  S  A  M  L  G  H  Q  H  S  F  F  P  A  L  A  L
       TGCCCCCGAACGGTGCTGCGGCGCTCTCCCTCCCGGGAGCCCTGGGCAAGCCCATTATGGATCAGCTGGTTGGCGCTGCGGAGACCGGCC  810
 47     P  P  N  G  A  A  A  L  S  L  P  G  A  L  G  K  P  I  M  D  Q  L  V  G  A  A  E  T  G  L
       TGCACTTCTCTTCTCTGGGTCACCAGGCTGCTGCCGCCCATCTCAGGCCTCTCAAAACCCTGGAGCCAGAAGAAGAGGTTGAAGATGACC  900
 77     H  F  S  S  L  G  H  Q  A  A  A  A  H  L  R  P  L  K  T  L  E  P  E  E  E  V  E  D  D  P
       CCAAAGTCCACCTGGAATCTAAGGAGCTTTGGGAGCAGTTTCACAAGCGCGGTACTGAAATGGTTATCACAAAATCAGGAAGACGAATGT  990
107     K  V  H  L  E  S  K  E  L  W  E  Q  F  H  K  R  G  T  E  M  V  I  T  K  S  G  R  R  M  F
       TCCCTCCGTTTAAAGTGAGGTGCACTGGTTTGGATAAAAAAGCCAAGTATATTTTGTTGATGGATATCGTTGCGGCCGACGACTGCAGGT 1080
137     P  P  F  K  V  R  C  T  G  L  D  K  K  A  K  Y  I  L  L  M  D  I  V  A  A  D  D  C  R  Y
       ACAAATTCCACAACTCTCGCTGGATGGTAGCCGGCAAGGCTGATCCTGAAATGCCCAAGCGAATGTACATTCACCCGGACAGCCCGGCCA 1170
167     K  F  H  N  S  R  W  M  V  A  G  K  A  D  P  E  M  P  K  R  M  Y  I  H  P  D  S  P  A  T
       CTGGAGAGCAATGGATGTCCAAGGTTGTCAATTTTCACAAACTTAAACTGACAAACAACATCTCCGATAAGCATGGATTTACGATTCTTA 1260
197     G  E  Q  W  M  S  K  V  V  N  F  H  K  L  K  L  T  N  N  I  S  D  K  H  G  F  T  I  L  N
       ACTCCATGCACAAATACCAGCCCAGGTTTCACGTTGTGAGGGCCAACGATATTTTAAAGCTTCCGTACAGTACTTTTCGGACTTATGTAT 1350
227     S  M  H  K  Y  Q  P  R  F  H  V  V  R  A  N  D  I  L  K  L  P  Y  S  T  F  R  T  Y  V  F
       TCCCAGAAACCGACTTCATCGCCGTGACTGCATACCAGAACGATAAGATAACTCAATTAAAAATTGACCACAATCCCTTTGCCAAGGGTT 1440
257     P  E  T  D  F  I  A  V  T  A  Y  Q  N  D  K  I  T  Q  L  K  I  D  H  N  P  F  A  K  G  F
       TTCGTGACACGGGCAACGGCAGAAGGGAGAAGAGGAAACAGTTGGCCTTGCAGTCCATGAGATCCTATGAAGAGCACCAGAAAAAAGACA 1530
287     R  D  T  G  N  G  R  R  E  K  R  K  Q  L  A  L  Q  S  M  R  S  Y  E  E  H  Q  K  K  D  N
       ACGTGACATCGGACGAGTCCTCCAGCGAGCAAGCGACCTTCAAATGCTTTGGTCAGGCCTTGTCCCCGGCTGTGTCGACTCTGAAAGACC 1620
317     V  T  S  D  E  S  S  S  E  Q  A  T  F  K  C  F  G  Q  A  L  S  P  A  V  S  T  L  K  D  L
       TCTGTCCCAGTGATTTAGACAGCGACAACGAAAGCAAAGATGGGCACCAACCGGAGCGAAATGACTCCAGTAAGATCTCTACTACAACTA 1710
347     C  P  S  D  L  D  S  D  N  E  S  K  D  G  H  Q  P  E  R  N  D  S  S  K  I  S  T  T  T  N
       ATGAGGACTCGAGGGATGAGAAAGAGAGCCCGTCCAAAAAACACGTATTTACCGCTAATGACCCTGTGAGCAGGGGTCGAGAGGAGCCCC 1800
377     E  D  S  R  D  E  K  E  S  P  S  K  K  H  V  F  T  A  N  D  P  V  S  R  G  R  E  E  P  L
       TGAGGACTGAACGGAGCCCCGCAGACTCCAGACAGAGCCCCGCCACCATCACCTCGAGCACGACAGGGATGCCGGGCAGGCAGGACATTA 1890
407     R  T  E  R  S  P  A  D  S  R  Q  S  P  A  T  I  T  S  S  T  T  G  M  P  G  R  Q  D  I  K
       AAAGCCCTATCCTTGACCCTCCTAAAGTGGACGAGTGCAGGCCACCGAACAAGGAAACGTATGTGCCCTTGACGGTTCAAACAGACAGCA 1980
437     S  P  I  L  D  P  P  K  V  D  E  C  R  P  P  N  K  E  T  Y  V  P  L  T  V  Q  T  D  S  S
       GCGCTCACTTGAGCCAGGGACACATGCATCATTTTGGATTTCCACCTGGTTTGGCTGGACAaCAGTTTTTTAACCCTCTGAGTGCTACGC 2070
467     A  H  L  S  Q  G  H  M  H  H  F  G  F  P  P  G  L  A  G  Q  Q  F  F  N  P  L  S  A  T  H
       ACCCATTTCTCTTGCACCCAAGTCAGTTTAACATGGGCGGCGCATTTTCTAACATGGCTGCTGCAGGCATAGGCCCCTTGTTGGCAGCTG 2160
497     P  F  L  L  H  P  S  Q  F  N  M  G  G  A  F  S  N  M  A  A  A  G  I  G  P  L  L  A  A  V
       TTTCGTCAGCGGGTGTTAGCACGATGGAGACCGCTAGCATCGCCTCCTCAGCCCAAGGACTGACTGCCACCTCTTCACTCCCCTTCCACT 2250
527     S  S  A  G  V  S  T  M  E  T  A  S  I  A  S  S  A  Q  G  L  T  A  T  S  S  L  P  F  H  L
       TACAGCAGCATGTACTGGCTTCACAGGGTCTGGCAATGTCACCATTCGGGAGCCTTTTCCCTTATCCGTACACCTACATGGCAGCAGCTG 2340
557     Q  Q  H  V  L  A  S  Q  G  L  A  M  S  P  F  G  S  L  F  P  Y  P  Y  T  Y  M  A  A  A  A
       CAGCTGCCTCGGCCTTTTCAGCAGCGTCGTCCTCTGTGCATCGCCACCCTTTTCTGAACGCAGTGCGCCCCCGTTTCCGGTACAGCCCTT 2430
587     A  A  S  A  F  S  A  A  S  S  S  V  H  R  H  P  F  L  N  A  V  R  P  R  F  R  Y  S  P  Y
       ACTCCATCCCCATGGGTCTACCGGACAGCAGCACCCTCCTTACCACGGCACTACACACTATGGGCAACAGCGCAGGAGAGCCCAAGCCGA 2520
617     S  I  P  M  G  L  P  D  S  S  T  L  L  T  T  A  L  H  T  M  G  N  S  A  G  E  P  K  P  S
       GCAACATGGCAACCAGTCCGGTCTCTGCAGCTATGGACTCGGCCTCTGAGGTCAACAGCAGGTCCTCCGCTATATCTTTAGGATCGGTCT 2610
647     N  M  A  T  S  P  V  S  A  A  M  D  S  A  S  E  V  N  S  R  S  S  A  I  S  L  G  S  V  S
       CCCTTTCTCCAAAATGGGCTCAGAAAAGGAGTCGACCAACGAACTGCAAAACATCCAACGCTTGGTCAGCGGACTTGACTCTAAACAGGA 2700
677     L  S  P  K  W  A  Q  K  R  S  R  P  T  N  C  K  T  S  N  A  W  S  A  D  L  T  L  N  R  T
       CAGATCAAGAAGCGGGTCTCCATAGGGAAGGGGGGGAAAAGAATCACTGAAAGATAACTAACTAATTAAAAGGAGTTCCGTCTCCAGCTA 2790
707     D  Q  E  A  G  L  H  R  E  G  G  E  K  N  H  *
       AGGCGGGTTTGGTTTTTTGCAGATCTATCAAACCAATCTTTTCAATGCACTTTGTTTACAATAAATAAGTACATAAATAAATAAATACTA 2880
       AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                                                             2908
```

图 1　西伯利亚鲟 *Tbx3* 基因 cDNA 全长及推测的氨基酸序列

Fig. 1　The nucleotide and deduced amino acid sequence of sturgeon *Acipenser baerii Tbx3* cDNA

GenBank 编号为 ADW77637。实线矩形框代表 5'-UTR 的终止密码子, 星号代表终止密码子, 虚线矩形框表示 cDNA 的加尾信号。单实线、虚线和双实线标记的氨基酸序列分别为 T-box 结构域(T-domain)、核定位信号和转录激活区。

Accession number in GenBank: ADW77637. The stop codon in 5'-UTR region is depicted on rectangle box. The asterisk represents the stop codon of ORF. The polyadenylation signal is depicted on dashed rectangular box. T-box domain (T-domain), nuclear localization signal and transcriptional activation domain of AbTbx3 are showed by full line, dotted line and doubled solid lines, respectively.

信号 ATTAAA, 且其后有一段多聚腺嘌呤序列。

为确定AbTbx3在T-box家族中的进化地位, 我们选取人、小鼠、猪、鸭嘴兽、鸡、爪蟾、斑马鱼、青鳉和西伯利亚鲟的 T-box 蛋白家族的序列, 以斑马鱼的转录因子 Tbx15 作为外类群, 利用 MEGA4 软件以邻接法构建 T-box 家族的系统进化树(图 2)。结果表明：AbTbx3 与其它几种 Tbx3 聚为一支, 而与 Tbx2 相分离, 且 Tbx2 和 Tbx3 又一起作为一个大的分支与 Tbx4 和 Tbx5 构成的分支相分离，并且 AbTbx3 与斑马鱼 Tbx3 呈现最近的亲缘关系, 共处于同一分支。

2.2　AbTbx3 的二级和三级结构预测

AbTbx3 与人 Tbx3 具有较高的同源性, 达到 73.5%。AbTbx3 序列的 105～292 位为 T-domain, 与人 Tbx3 的 T-domain 同源性达到 95.2%。T-doman 核心区序列为 KLTNN; 334～357 为核定位信号, 358～442 为转录激活区(图 1)。利用 SWISS-MODEL (SIB)对 AbTbx3 的 T-domain 进行二级结构和三维结构预测, 结果显示：AbTbx3 转录因子的 T-domain 包含 6 个 α 螺旋和 16 个 β 折叠, 且西伯利亚鲟 Tbx3 的 T-domain 与人 Tbx3 的 T-domain 两者在三维结构的相似度达到 95%(图 3)。

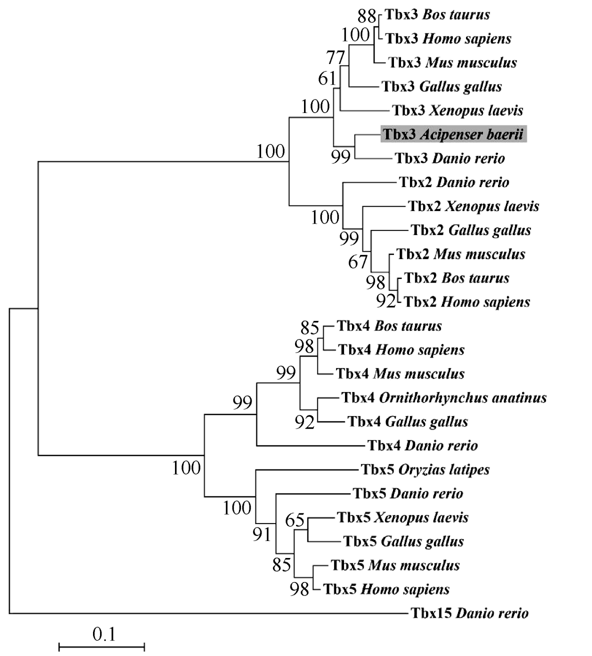

图 2 基于不同物种的 Tbx 序列，用 MEGA4.0 构建的系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of AbTbx3 and representative Tbxs from other species constructed by MEGA4

Bootstrap 置信度百分率在节点标明。

Bootstrap majority consensus values are indicated at each branch point in percent.

2.3 *AbTbx3* 基因在西伯利亚鲟胚胎和各组织中半定量分析

为了确定 *AbTbx3* 基因在西伯利亚鲟胚胎发育和成体各组织中的作用，我们利用 RT-PCR 分析 *AbTbx3* 基因在西伯利亚鲟胚胎和成体各组织中的相对表达情况(图 4)。我们发现 *AbTbx3* 在胚胎发育阶段表达较强，在受精后 10 h(10 期)即开始表达，随着发育的进行其表达量逐渐加强，至受精后 52 h (24 期)表达达到最高，随后稍有下降。而在西伯利亚鲟成体各组织中，*AbTbx3* 在眼、脑、鳃、肠、胸鳍和腹鳍中有表达；在肝、血液、心脏、肾和肌肉中未检测到其表达。

2.4 *AbTbx3* 基因在西伯利亚鲟早期发育中的时空表达

为进一步阐明 *AbTbx3* 在胚后器官形成中的作用，我们利用整体原位杂交分析了西伯利亚鲟 37 期(受精后 5 d)和 43 期(受精后 11～12 天)仔鱼中 *AbTbx3* 的时空表达模式。在 37 期时，*AbTbx3* 在鲟鱼胚胎的后脑外沿的边缘出现微弱的表达；同时，

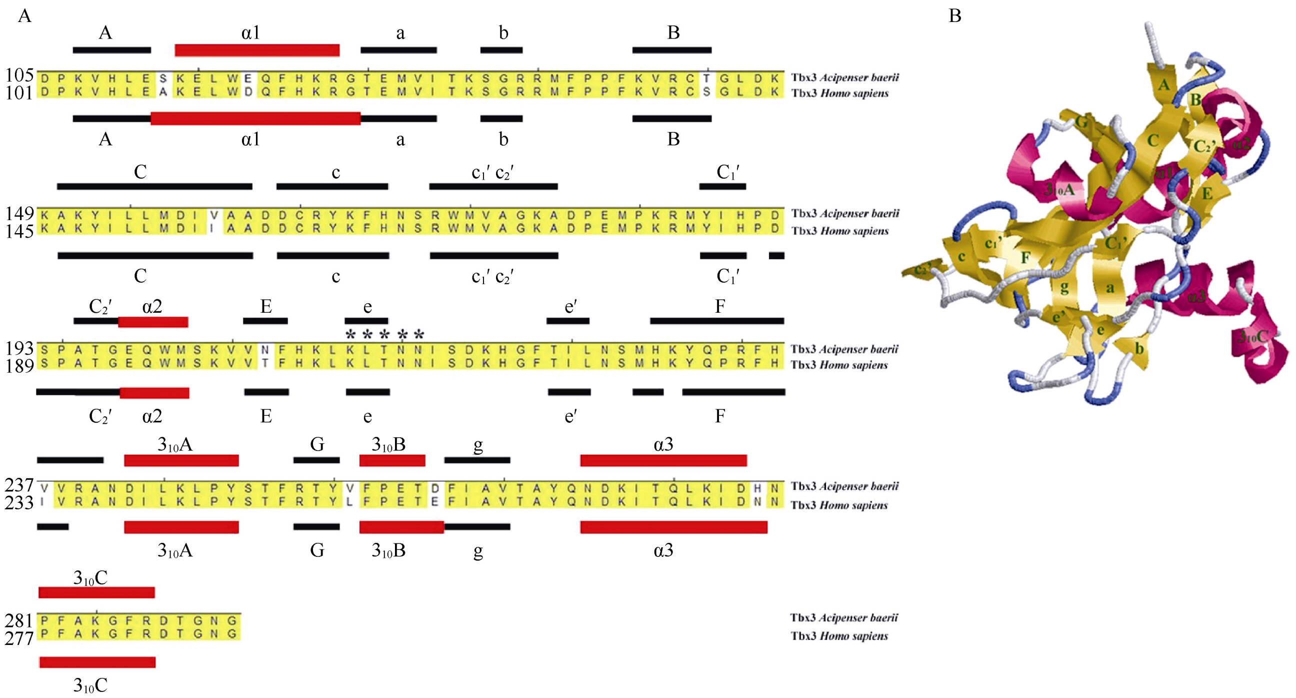

图 3 西伯利亚鲟 Tbx3 T-box 结构域(T-domain)二级和三级结构预测

Fig. 3 The prediction of secondary and three-dimensional structure for T-domain of AbTbx3

A：西伯利亚鲟和人 Tbx3 的同源比对及二级结构预测。保守残基标记为亮黄色背景。二级结构元件分别标在它们序列的上方和下方，红色和黑色条带分别代表螺旋和折叠结构，条带上方字母分别与 B 图中各元件相对应。B：西伯利亚鲟 Tbx3 的 T-domain 的三维结构模建。图中的黄色箭头表示 β 折叠，粉色螺旋结构表示 α 螺旋。

A: Alignment of T-box domain(T-domain) of AbTbx3 and human Tbx3 and prediction of secondary structure. The conserved residues are depicted on a light yellow background. Secondary structure elements for AbTbx3 and human Tbx3 are given above and below the sequences, respectively. Red and black bands represent the helices and strands, respectively. B: The modeling of three-dimensional structure for T-domain of AbTbx3. Helices and strands are depicted in pink and yellow, respectively.

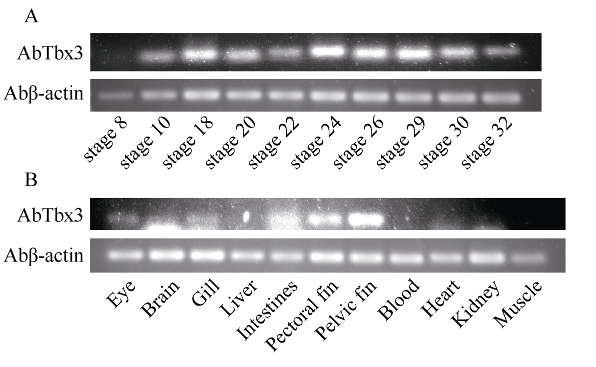

图 4　西伯利亚鲟 *Tbx3* 基因表达的 RT-PCR 检测

Fig. 4　Detection of *AbTbx3* expression in *Acipencer baerii* by reverse transcription PCR

A：西伯利亚鲟 *Tbx3* 在不同胚胎发育时期的表达。B：西伯利亚鲟 *Tbx3* 在成体各组织中的表达。采用 *β-actin* 作为内参基因。

A: Expression of *AbTbx3* in different stages of embryonic development. B: Expression of *AbTbx3* in various adult tissues (or organs). *β-actin* is used as a reference gene.

在耳泡的背部、前喙部边缘和脊索后部也可见 *AbTbx3* 的表达(图 5A、A'、B、B')。发育至 43 期，*AbTbx3* 在耳泡中的表达范围进一步向外延伸，形成类似内耳三个半规管的结构(前、后、侧半规管)且呈强烈表达。虽然背面观中在后脑区域未见 *AbTbx3* 的表达(图 5C、C')，这可能是由于其被已经骨化的头盖骨遮挡的缘故，但在侧面观图片中(图 5D、D')可清晰的看到 *AbTbx3* 在后脑的表达已由边缘向内覆盖至整个后脑。此时，在眼正上方的松果体腺中出现了明显的 *AbTbx3* 的表达斑块。同时，在整个背鳍芽都可见 *AbTbx3* 的表达，且在侧面观中，展示出 *AbTbx3* 在背鳍芽靠近头部的一端表达最为强烈。

3　讨　论

本研究首次在软骨硬鳞鱼西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)中克隆得到了 *Tbx3* 基因的 cDNA 全长，该序列具有完整的开放阅读框。AbTbx3 与人 Tbx3 的同源性达到 73.5%，其中 T-domain 的同源性更是高达 95.2%。另外，经预测发现 AbTbx3 与人 Tbx3 两者的 T-domain 在二级和三级结构均高度同源(图 3)。这表明 Tbx3 在从鱼类向人类的脊椎动物进化过程中高度保守。Tbx2/3/4/5 同属于 TBX2 这一古老的亚家族。在头索动物文昌鱼中，TBX2 分化产生 Tbx2/3 和 Tbx4/5 两亚型(Ruvinsky & Gibson-Brown, 2000)，而这两个亚型在硬骨鱼和两栖类分化之前又进一步发生了分歧，产生 Tbx2、Tbx3、Tbx4 和 Tbx5 四个独立的基因，(Gibson-Brown et al, 1996; Ruvinsky & Silver, 1997)。目前在鲨鱼中发现 Tbx4 和 Tbx5 已经分化(Tanaka et al, 2002)，但关于 Tbx2 和 Tbx3 在何时开始分化还未见报道。我们在软骨硬鳞鱼中克隆了 *Tbx3* 基因，该基因与人 Tbx3 高度同源，而与人 Tbx2 同源性较低。据我们的结果推测，西伯利亚鲟中可能还存在着 Tbx2 的同系物。这表明 Tbx2/Tbx3 的分歧时间应在软骨鱼和硬骨鱼分化之前。为了阐明脊椎动物 T-box 基因家族的进化历程，还需进一步在鲨鱼和鲟鱼等原

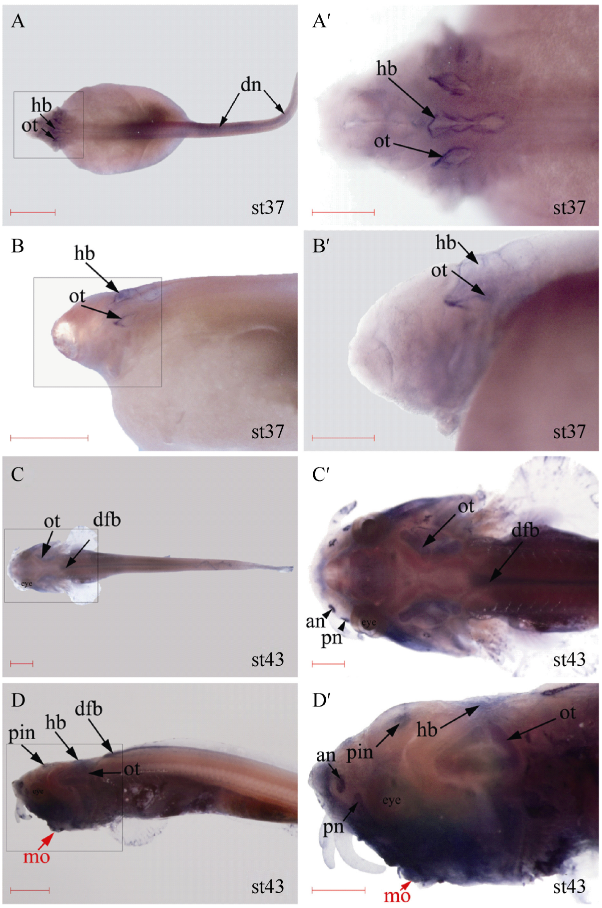

图 5　*AbTbx3* 基因在鲟鱼仔鱼中的表达

Fig. 5　*AbTbx3* expression in embryos of sturgeon, *Acipenser baerii*

A、B：37 期（受精后 5 d）仔鱼，A 为背面观，B 为侧面观。C、D：43 期（受精后 11～12 d）仔鱼，C 为背面观，D 为侧面观。图 A'-D'分别是其左侧相邻图 A-D 黑色方框区域内对应的放大。hb，后脑；dn，背部脊索；ot，听囊；dfb，背鳍芽；pin，松果体腺；an，前鼻孔；pn，后鼻孔；mo，口。图 A-D 中的标尺代表 1 000 μm，图 A'-D' 中的标尺代表 500 μm。

(A, B): At stage 37(5 days post-fertilization),(A) is dorsal view,(B) is lateral view.(C, D): At stage 43(11−12 days post-fertilization),(C) is dorsal view,(D) is lateral view. Panel(A' −D') are higher-power views of boxed area in panel(A−D), respectively. Abbreviations: hb, hindbrain; dn; dorsal notochord; ot, otic vesicle; dfb, dorsal fin bud; pin, pineal gland; an, anterior nares; pn, posterior nares; mo, mouth. Scale bars in A−D represent 1000 μm, and in A' −D' represent 500 μm.

始有颌类中寻找是否确实存在 Tbx2 的同系物。

关于 *Tbx3* 基因表达和功能的研究，大部分集中在胚胎发育过程中的形态发生和器官形成。我们在西伯利亚鲟中也发现，*AbTbx3* 基因从囊胚早期就开始表达，到尾芽早期表达达到峰值(图 4A)。另外我们还通过对西伯利亚鲟仔鱼和成体各组织 *AbTbx3* 基因的表达模式分析，发现该基因在仔鱼和成体的多个组织和器官中都有表达，并且其表达模式具有时空特异性。仔鱼期主要在耳泡、后脑、松果体、脊索和背鳍芽表达，而成体时在眼、脑、鳃、肠、胸鳍和腹鳍表达(图 4B，图 5)。由此可见，西伯利亚鲟 *Tbx3* 基因的功能非常广泛，不仅在胚胎发育中起作用，同时在仔鱼和成体多个组织器官中也有重要功能。值得注意的是，*AbTbx3* 在成体胸鳍和腹鳍中都有表达，在爪蟾和蝾螈中 *Tbx* 基因在成体中都存在这种持续性表达现象(Simon et al, 1997; Takabatake et al, 2002)。蝾螈的 *Tbox1* 基因在前肢的再生过程中表达增强，参与前肢的再生作用(Simon et al, 1997)。而鱼类胸鳍和腹鳍同样具有再生能力，因此，我们推测 *AbTbx3* 基因在成体胸鳍和腹鳍的表达可能与它们的再生能力相关。至于 *AbTbx3* 是否确实参与再生以及如何参与，将需要在接下来的工作加以阐明。

致谢：大连永新鲟鱼开发有限公司和北京水产科学研究所房山十渡鱼类养殖中心热情提供实验所用材料西伯利亚鲟；郑伟同学在鲟鱼解剖过程中给予的帮助；李超、周婷婷、刘鑫同学在鲟鱼组织研磨过程中给予的帮助以及实验室其他老师和同学对本研究提供了宝贵意见，为此，作者表示衷心的感谢。

参考文献：

Agulnik SI, Garvey N, Hancock S, Ruvinsky I, Chapman DL, Agulnik I, Bollag R, Papaioannou V, Silver LM. 1996. Evolution of mouse T-box genes by tandem duplication and cluster dispersion[J]. *Genetics*, **144**(1): 249-254.

Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. 2001. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease[J]. *Cell*, **106**(6): 709-721.

Conlon FL, Fairclough L, Price BM, Casey ES, Smith JC. 2001. Determination of T box protein specificity[J]. *Development*, **128**(19): 3749-3758.

Dobrovolskaia-Zavadskaia N. 1927. Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouveau-née et sur l'existence d'un caractère (facteur) héréditaire "non-viable"[J]. *C R Soc Biol*, **97**: 114-116.

Eriksson KS, Mignot E. 2009. *T-box* 3 is expressed in the adult mouse hypothalamus and medulla[J]. *Brain Res*, **1302**: 233-239.

Gibbs MA, Northcutt RG. 2004. Development of the lateral line system in the shovelnose sturgeon[J]. *Brain Behav Evol*, **64**(2): 70-84.

Gibson-Brown JJ, Agulnik SI, Chapman DL, Alexiou M, Garvey N, Silver LM, Papaioannou VE. 1996. Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity[J]. *Mech Develop*, **56**(1-2): 93-101.

Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR, Lehrach H. 1990. Cloning of the *T* gene required in mesoderm formation in the mouse[J]. *Nature*, **343**(6259): 617-622.

Horton AC, Mahadevan NR, Minguillon C, Osoegawa K, Rokhsar DS, Ruvinsky I, de Jong PJ, Logan MP, Gibson-Brown JJ. 2008. Conservation of linkage and evolution of developmental function within the Tbx2/3/4/5 subfamily of T-box genes: implications for the origin of vertebrate limbs[J]. *Dev Genes Evol*, **218**(11-12): 613-628.

Jerome-Majewska LA, Jenkins GP, Ernstoff E, Zindy F, Sherr CJ, Papaioannou VE. 2005. *Tbx3*, the ulnar-mammary syndrome gene, and *Tbx2* interact in mammary gland development through a $p19^{Arf}$/p53-independent pathway[J]. *Dev Dynam*, **234**(4): 922-933.

Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, St. Jore B, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultchi AI, Morrow BE, Kucherlapati R. 2001. *TBX1* is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome[J]. *Cell*, **104**(4): 619-629.

Mesbah K, Harrelson Z, Théveniau-Ruissy M, Papaioannou VE, Kelly RG. 2008. Tbx3 is required for outflow tract development[J]. *Circ Res*, **103**(7): 743-750.

Minguillon C, Logan M. 2003. The comparative genomics of T-box genes[J]. *Brief Funct Genomic Proteomic*, **2**(3): 224-233.

O'Neill P, McCole RB, Baker CVH. 2007. A molecular analysis of neurogenic placode and cranial sensory ganglion development in the shark, *Scyliorhinus canicula*[J]. *Dev Biol*, **304**(1): 156-181.

Papaioannou VE, Silver LM. 1998. The T-box gene family[J]. *Bioessays*, **20**(1): 9-19.

Ruvinsky I, Gibson-Brown JJ. 2000. Genetic and developmental bases of serial homology in vertebrate limb evolution[J]. *Development*, **127**(24): 5233-5244.

Ruvinsky I, Silver ML. 1997. Newly identified paralogous groups on mouse chromosomes 5 and 11 reveal the age of a T-Box cluster duplication[J]. *Genomics*, **40**(2): 262-266.

Schlosser G, Ahrens K. 2004. Molecular anatomy of placode development in *Xenopus laevis*[J]. *Dev Biol*, **271**(2): 439-466.

Simon HG, Kittappa R, Khan PA, Tsilfidis C, Liversage RA, Oppenheimer S. 1997. A novel family of T-box genes in urodele amphibian limb development and regeneration: candidate genes involved in vertebrate forelimb/hindlimb patterning[J]. *Development*, **124**(7): 1355-1366.

Song W, Song JK, Fan CX, Zhang T, Wang B. 2010. Studies on the early embryonic development of artificially-bred Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*)[J]. *J Fish Chn*, **34**(5): 779-785. [宋炜, 宋佳坤, 范纯新, 张涛, 王斌. 2010. 全人工繁殖西伯利亚鲟的早期胚胎发育[J]. 水产学报, **34**(5): 779-785.]

Suzuki T, Takeuchi J, Koshiba-Takeuchi K, Ogura T. 2004. *Tbx* genes specify posterior digit identity through Shh and BMP signaling[J]. *Dev Cell*, **6**(1): 43-53.

Takabatake Y, Takabatake T, Takeshima K. 2002. Conserved and divergent expression of *T-box* genes *Tbx2-Tbx5* in *Xenopus*[J]. *Mech Dev*, **91**(1-2): 433-437.

Tanaka M, Münsterberg A, Anderson WG, Prescott AR, Hazon N, Tickle C. 2002. Fin development in a cartilaginous fish and the origin of vertebrate limbs[J]. *Nature*, **416**(6880): 527-531.

Wilson V, Conlon FL. 2002. The T-box genes[J]. *Genome Biol*, **3**(6): 3008.1-3008.7.